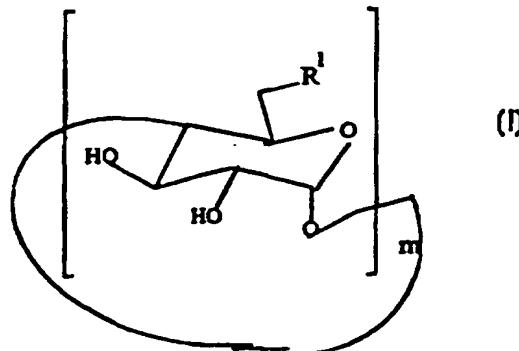




DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C08B 37/16, A61K 47/40		A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 97/33919 (43) Date de publication internationale: 18 septembre 1997 (18.09.97)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR97/00449</p> <p>(22) Date de dépôt international: 13 mars 1997 (13.03.97)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 96/03221 14 mars 1996 (14.03.96) FR</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE [FR/FR]; 3, rue Michel-Ange, F-75794 Paris Cédex 16 (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): DEFAYE, Jacques [FR/FR]; 202, chemin du Vercors, F-38330 Saint-Ismier (FR). ORTIZ-MELLET, Carmen [ES/ES]; Rue Cristobal Sanchez Fuentes, 14 D, E-41011 Séville (ES). GARCIA-FERNANDEZ, José-Manuel [ES/ES]; Rue Cristobal Sanchez Fuentes, 14 D, E-41011 Séville (ES).</p> <p>(74) Mandataire: BREVATOME; 25, rue de Ponthieu, F-75008 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</p>	
<p>(54) Title: THIOUREIDO-CYCLODEXTRINS PARTICULARLY USEFUL FOR SOLUBILISING ANTITUMORAL AND ANTIPARASITIC AGENTS, AND METHODS FOR PREPARING SAME</p> <p>(54) Titre: THIOUREIDO-CYCLODEXTRINES, UTILISABLES EN PARTICULIER POUR SOLUBILISER DES AGENTS ANTITUMORAUX ET ANTIPARASITAIRES ET LEURS PROCEDES DE PREPARATION</p> <p>(57) Abstract</p> <p>Thioureido-cyclodextrins particularly useful for solubilising antitumoral and antiparasitic agents, and methods for preparing same, are disclosed. The thioureido-cyclodextrins are of formula (I), wherein m is 6, 7 or 8, R¹ is OH or NH-CS-NHR₂, with at least one R¹ being NH-CS-NHR₂, and R² is an alkyl, monosaccharide, oligosaccharide, glycosyl-amino acid or glycopeptide group. Said cyclodextrins are useful for solubilising antitumoral and antiparasitic agents from the taxol family.</p> <p>(57) Abrégé</p> <p>L'invention concerne des thiouréido-cyclodextrines, utilisables en particulier pour solubiliser des agents antitumoraux ou antiparasitaires et leurs procédés de préparation. Ces thiouréido-cyclodextrines répondent à la formule (I) avec m = 6, 7 ou 8; R¹ représente OH ou NH-CS-NHR₂, au moins l'un des R¹ étant -NH-CS-NHR₂; R² représente un groupe alkyle, monosaccharide, oligosaccharide, glycosyl-aminoacide ou glycopeptide. Ces cyclodextrines sont utilisables pour solubiliser des agents antitumoraux ou antiparasitaires de la famille du Taxol.</p>			



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Arménie	GB	Royaume-Uni	MW	Malawi
AT	Autriche	GE	Géorgie	MX	Mexique
AU	Australie	GN	Guinée	NE	Niger
BB	Barbade	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BE	Belgique	HU	Hongrie	NO	Norvège
BF	Burkina Faso	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BG	Bulgarie	IT	Italie	PL	Pologne
BJ	Bénin	JP	Japon	PT	Portugal
BR	Brésil	KE	Kenya	RO	Roumanie
BY	Bélarus	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CA	Canada	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CF	République centrafricaine	KR	République de Corée	SE	Suède
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapour
CH	Suisse	LI	Liechtenstein	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LR	Libéria	SN	Sénégal
CN	Chine	LT	Lituanie	SZ	Swaziland
CS	Tchécoslovaquie	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CZ	République tchèque	LV	Lettonie	TG	Togo
DE	Allemagne	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DK	Danemark	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
EE	Estonie	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	UG	Ouganda
FI	Finlande	MN	Mongolie	US	Etats-Unis d'Amérique
FR	France	MR	Mauritanie	UZ	Ouzbékistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

THIOUREIDO-CYCLODEXTRINES, UTILISABLES EN PARTICULIER
POUR SOLUBILISER DES AGENTS ANTITUMORAUX ET
ANTIPARASITAIRES ET LEURS PROCEDES DE PREPARATION

5 DESCRIPTION

La présente invention a pour objet de nouveaux dérivés de cyclodextrines, des thiouréido-cyclodextrines, qui sont utilisables en particulier 10 pour solubiliser dans un milieu aqueux des agents antitumoraux et antiparasitaires, notamment ceux de la famille du Taxol.

Les cyclodextrines, ou cyclomaltooligosaccharides, sont des oligosaccharides cycliques qui 15 ont la propriété d'inclure dans leur cavité des molécules diverses, de taille adaptée à celle de la structure hôte. Le caractère généralement apolaire de ces associations conduit à inclure préférentiellement des structures de type hydrophobe, permettant notamment 20 la solubilisation dans l'eau de composés peu ou pas solubles dans ces milieux.

La solubilité relativement faible dans l'eau des cyclodextrines, et notamment de la plus accessible d'entre elles sur le plan économique, la 25 β -cyclodextrine (18 g/l à 25°C) limite cependant leur utilisation dans ce but.

Pour remédier à cette situation, on a modifié chimiquement les cyclodextrines pour améliorer leur solubilité dans l'eau. Ainsi, on a décrit dans les 30 documents WO-A-95/19994, WO-A-95/21870 et EP-A-0 403 366 des dérivés ramifiés de cyclodextrines comportant un ou plusieurs substituants monosaccharidiques ou oligosaccharidiques liés à la cyclodextrines par un atome d'oxygène ou de soufre 35 ainsi que leur utilisation. Ces cyclodextrines

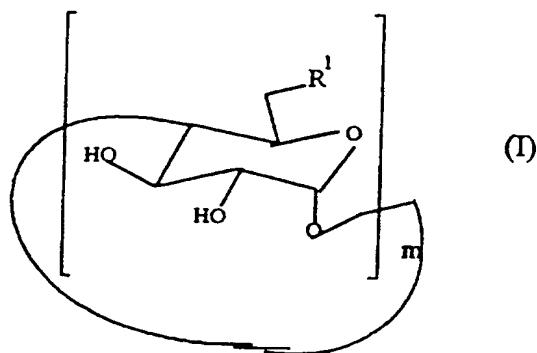
ramifiées sont en particulier susceptibles de se combiner avec le Taxol et ses dérivés, en particulier le Taxotère®, qui sont des agents antitumoraux et antiparasitaires, comme il est décrit par P. Potier 5 dans Chem. Soc. Rev., 21, 1992, pp. 113-119, M.C. Bissery et al dans Cancer Research, 51, 1991, pp. 4845-4852 et J. Schrével et al dans Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol 91, pp. 8472-8476, 1994. On obtient ainsi des complexes d'inclusion, ce qui permet de 10 solubiliser dans l'eau ces agents antitumoraux. A titre d'exemple, la solubilité dans l'eau du Taxotère® qui est 0,004 g/l, peut être amenée jusqu'à 6,5 g/l par encapsulation dans le $6^I\text{-S-}\alpha\text{-maltosyl-}6^I\text{-thiocyclo-}$ maltoheptaose, comme il est décrit dans WO-A-95/19994.

15 Le document EP-A-0 605 753 décrit des complexes d'inclusion du Taxol utilisant des cyclodextrines ramifiées telles que les maltosyl-cyclodextrines, pour augmenter la solubilité du Taxol dans l'eau.

20 Des dérivés de cyclodextrines comportant un ou plusieurs substituants glycosyle ou maltosyle liés à la cyclodextrine par un atome de soufre sont également décrits par V. Lainé et al dans J. Chem. Soc., Perkin Trans, 2, 1995, pp. 1479-1487. Ces dérivés ont été testés pour solubiliser une substance active telle que 25 la prednisolone.

La présente invention a pour objet d'autres dérivés de cyclodextrines présentant non seulement un intérêt pour la solubilisation de substances actives, en particulier d'agents antitumoraux et 30 antiparasitaires de la famille du Taxol, mais permettant de plus un ciblage et une vectorisation de la substance active sur les organes à traiter.

Les nouveaux dérivés de cyclodextrines sont des thiouréido-cyclodextrines répondant à la formule :



dans laquelle m est égal à 6, 7 ou 8 et les R^1 qui peuvent être identiques ou différents, représentent OH 5 ou NH-CS-NHR² avec R² représentant un groupe alkyle, un groupe dérivé d'un monosaccharide ou d'un oligo saccharide éventuellement substitué, un groupe dérivé d'un glycosyl-aminoacide ou un groupe dérivé d'un glycopeptide, à condition que l'un au moins des R¹ 10 représente NH-CS-NHR².

Dans ces nouveaux dérivés, la présence d'une liaison ou d'un espaceur de type thiourée -NH-CS-NH- au lieu d'un atome d'oxygène ou de soufre pour lier le substituant R² est intéressante, notamment pour associer 15 la cyclodextrine à un motif hydrophile tel qu'un dérivé glucidique, en raison de la simplicité de la réaction de couplage. Par ailleurs, les thiourées sont des composés de grande stabilité et de structure bien définie qui peuvent être couplées à de nombreux 20 substituants, comme on le verra plus loin. Des composés de type thiourée ont d'ailleurs été utilisés pour la préparation de néo-glycoconjugués comme il est décrit par Z.J. Witczak, Adv. Carbohydr. Chem., 44, 1986, pp 91-145 et C.M. Reichert, C.E. Hayes et 25 I.J. Goldstein, Methods Enzymol., 242, 1994, pp. 108-117).

Les thiouréidos-cyclodextrines répondant à la formule (I) donnée ci-dessus peuvent être des cyclodextrines monosubstituées, persubstituées ou

partiellement substituées en position alcool primaire, selon le nombre de R¹ représentant NH-CS-NHR². Par ailleurs, le(s) substituant(s) R² peuvent être de divers types.

5 Ainsi R² peut représenter un groupe alkyle de 1 à 10 atomes de carbone, par exemple le groupe méthyle. R² peut aussi représenter des groupes dérivés de monosaccharides ou d'oligosaccharides éventuellement substitués. A titre d'exemple de groupes dérivés de 10 monosaccharides, on peut citer les groupes dérivés du glucose et du galactose, sous forme α ou β . Dans le cas où le groupe dérivé de monosaccharide est substitué, un ou plusieurs des groupes hydroxyle du monosaccharide peuvent être remplacés par des groupes alcoxy de 1 à 15 16 atomes de carbone, des groupes acyloxy comme le groupe acétoxy, des groupes amines et amides. Les groupes dérivés d'oligosaccharides peuvent être les groupes maltosyle, maltotriosyle, lactosyle, ou encore de tri- ou tétrasaccharides marqueurs d'affinité 20 cellulaire du type Lewis X ou Sialyl Lewis X, ou encore des oligosaccharides dérivés de l'héparine. Ils peuvent également être substitués par des groupes alcoxy, acyloxy, ou aminés.

25 Selon l'invention R² peut également représenter un groupe dérivé d'un glycosyl-aminoacide ou d'un glycopeptide.

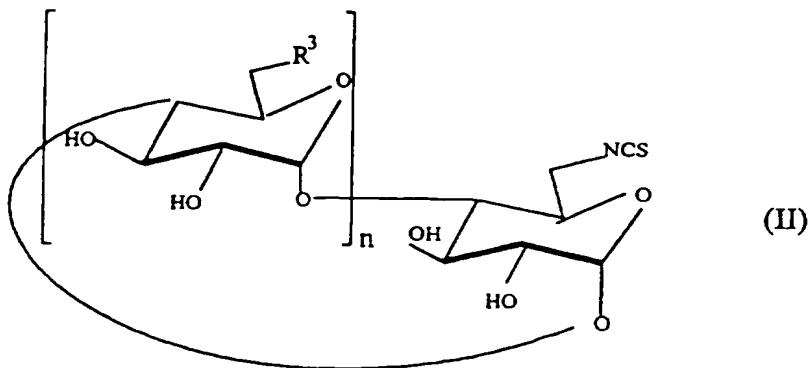
Les aminoacides susceptibles d'être utilisés sont en particulier les aminoacides naturels tels que l'alanine, la cystéine, l'acide aspartique, l'acide 30 glutamique, la phénylalanine, la glycine, l'histidine, l'isoleucine, la lysine, la leucine, la méthionine, l'asparagine, la proline, la glutamine, l'arginine, la sérine, la thréonine, la valine, le tryptophane, et la tyrosine. On peut aussi utiliser des acides aminés 35 modifiés.

Dans le cas où le groupe R^2 comprend un peptide, celui-ci peut être formé à partir des acides aminés décrits ci-dessus et comprendre également des acides aminés modifiés.

5 La présence d'un groupe R^2 du type glycosyl-aminoacide ou glycopeptide permet de conférer à la cyclodextrine une affinité particulière pour certains sites biologiques car ce groupe peut jouer le rôle de marqueur de reconnaissance externe moléculaire et
10 cellulaire. Ainsi, cette modification de la cyclodextrine peut permettre le ciblage et la vectorisation d'une substance active incluse dans la cyclodextrine.

15 Les dérivés de cyclodextrine de l'invention peuvent être préparés par deux voies différentes. La première voie (procédé A) consiste à faire réagir une isothiocyanato-cyclodextrine avec une amine comportant le groupe R^2 . La seconde voie (procédé B) consiste à faire réagir une amino-cyclodextrine avec un dérivé
20 comportant une fonction isothiocyanate comportant le groupe R^2 .

Aussi, la présente invention a pour objet un premier procédé (procédé A) de préparation d'une thiouréido-cyclodextrine répondant à la formule (I) donnée ci-dessus, qui consiste à faire réagir une isothiocyanato-cyclodextrine de formule :

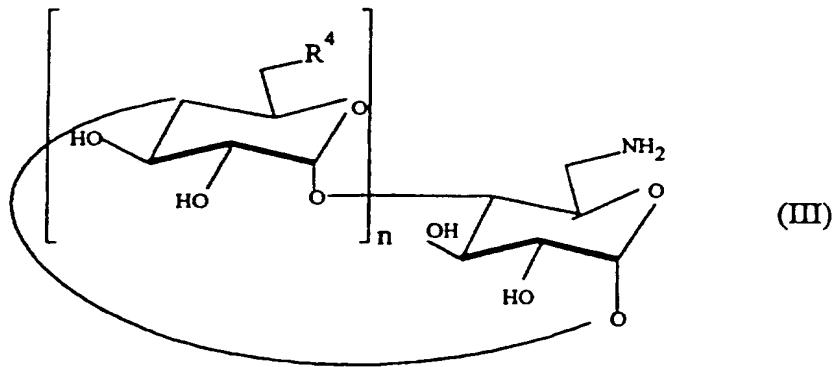


dans laquelle les R^3 qui peuvent être identiques ou différents, représentent NCS ou OH et n est égal à 5, 6 ou 7, avec une amine de formule R^2-NH_2 .

5 Cette réaction peut être effectuée dans un solvant organique tel que la pyridine.

L'isothiocyanato-cyclodextrine de formule (II) utilisée comme produit de départ dans ce procédé peut être préparée par réaction de l'amino-cyclodextrine correspondante avec du thiophosgène. On peut utiliser 10 pour cette préparation le procédé décrit par J.M. Garcia Fernandez et al dans Carbohydr. Res., 268, 1995, pp 57-71.

15 Le second procédé (procédé B) de préparation des thiouréido-cyclodextrines de formule (I) de l'invention consiste à faire réagir une amino-cyclodextrine de formule :



20 dans laquelle les R^4 qui peuvent être identiques ou différents, représentent OH ou NH_2 , et n est égal à 5, 6 ou 7,

avec un isothiocyanate de formule : R^2-NCS dans 25 laquelle R^2 a la signification donnée ci-dessus.

dans laquelle les R^4 qui peuvent être identiques ou différents, représentent OH ou NH_2 , et n est égal à 5, 6 ou 7,

avec un isothiocyanate de formule : R^2-NCS dans laquelle R^2 a la signification donnée ci-dessus.

Cette réaction peut être effectuée dans un solvant organique tel que la pyridine.

5 Les amino-cyclodextrines de départ de formule (III) peuvent être préparés par le procédé décrit par J. M. Garcia Fernandez et al décrit dans le document Carbohydr. Res., 268, 1995, pp. 57-71, mentionné ci-dessus.

10 Lorsque R^2 est un groupe dérivé d'un monosaccharide, d'un oligosaccharide, d'un glycosyl-aminoacide ou d'un glycopeptide, l'isothiocyanate de formule R^2-NCS peut être préparé par réaction du thiophosgène sur un aminodésoxyglycose ou une 15 glycosylamine.

15 Dans le cas du procédé A, lorsqu'on utilise comme réactif une amine de formule : R^2-NH_2 dans laquelle R^2 représente un groupe dérivé d'un monosaccharide, d'un oligosaccharide, d'un glycosyl- 20 amino-acide ou d'un glycopeptide, cette amine peut être préparée par le procédé décrit par J. M. Garcia Fernandez et al dans J. Org. Chem., 58, 1993, pp. 5192-5199.

25 Les procédés décrits ci-dessus pour l'obtention des thiouréido-cyclodextrines de l'invention sont très intéressants car ils permettent d'obtenir les dérivés voulus avec des rendements élevés.

30 Les thiouréido-cyclodextrines de l'invention sont utilisables en particulier pour solubiliser en milieu aqueux des composés chimiques hydrophobes, notamment des agents anti-tumoraux appartenant à la famille du Taxol.

Aussi, l'invention concerne également les complexes d'inclusion des thiouréido-cyclodextrines de 35 formule (I) avec un composé chimique, en particulier

hydrophobe, tel qu'une molécule pharmaceutiquement active.

De préférence, dans ces complexes d'inclusion, le composé chimique est un agent antitumoral ou 5 antiparasitaire, notamment de la famille du Taxol comme le Taxol et le Taxotère®.

Ces complexes d'inclusion peuvent être préparés par des procédés classiques, par exemple en ajoutant à une solution ou à une suspension de la thiouréido-10 cyclodextrine de formule (I) utilisée, le composé chimique en solution ou à l'état pur. On peut ensuite isoler le complexe d'inclusion ainsi formé par lyophilisation.

Dans le cas où on ajoute le composé en 15 solution, par exemple l'agent antitumoral de la famille du Taxol, on utilise une solution concentrée du composé dans un solvant organique miscible à l'eau, par exemple l'acétone, et on soumet ensuite le mélange obtenu à une agitation et à un barbotage de gaz inerte tel que 20 l'azote, pour éliminer le solvant organique.

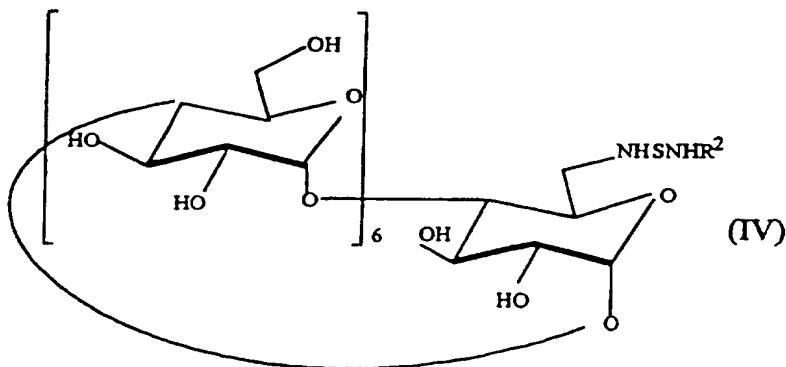
Dans le cas des composés de la famille du Taxol tels que le Taxotère, on peut aussi disperser ce produit à l'état pur dans une solution stérile d'une thiouréido-cyclodextrine conforme à l'invention.

25 L'invention a encore pour objet une composition pharmaceutique comprenant un complexe d'inclusion d'un dérivé de cyclodextrine de formule (I) et d'une molécule pharmacologiquement active telle qu'un agent antitumoral ou antiparasitaire, avec un véhicule pharmacologiquement acceptable.

30 Ces compositions pharmaceutiques qui peuvent être administrée par voie orale ou parentérale, sont par exemple des solutions, des poudres, des suspensions etc., en particulier des solutions injectables.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront mieux à la lecture des exemples suivants donnés bien-entendu à titre illustratif et non limitatif.

5 Ces exemples se rapportent à des thiouréido-cyclodextrines répondant à la formule suivante :



10 Exemple 1 : Préparation du 6^{I} -désoxy- 6^{I} -(N' -méthylthioureido)cyclomaltoheptaose (composé n°1)

Ce composé répond à la formule (IV) donnée ci-dessus avec $\text{R}^2 = \text{CH}_3$.

15 Ce composé est obtenu par condensation du 6^{I} -amino- 6^{I} -désoxycyclomaltoheptaose avec le méthyl isothiocyanate (procédé B).

1. Préparation du 6^{I} -amino- 6^{I} -désoxycyclomaltoheptaose.

20 A une solution de 6^{I} -azido- 6^{I} -désoxycyclomaltoheptaose (R.C. Petter, J.S. Salek, C.T. Sikorski, G. Kumaravel et F.-T. Lin, J. Am. Chem. Soc., 112, 1990, pp 3860-3868) dans le N,N -diméthylformamide (DMF, 10 ml), on ajoute le 1,3-propanedithiol (0,62 ml, 6,15 mmol) et l'éthyldiisopropylamine (0,65, ml, 3,69 mmol). Le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 16 h, puis additionné d'acétone (100 ml). Le précipité obtenu est filtré, lavé avec de l'acétone, redissous dans l'eau (100 ml)

et filtré sur Celite. Après lyophilisation de la solution aqueuse, on obtient 1,34 g de l'amine (rendement 92 %) ayant les données de ^{13}C RMN décrites dans la littérature (S.E. Brown, J. H. Coates, 5 D.R. Coghlan, C.J. Easton, S.J. van Eyk, W. Janowski, A. Lapore, S.F. Lincoln, Y. Luo, B.L. May, D.S. Schiesser, P. Wang et M.L. Williams, Aust. J. Chem., 46, 1993, pp. 953-958).

2. Préparation du composé n°1.

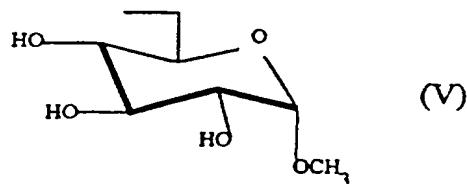
10 A une solution du 6^{I} -amino- 6^{I} -désoxycyclomaltoheptaose obtenu en 1 (100 mg, 0,09 mmol) dans de la pyridine (2 ml), on ajoute l'isothiocyanate de méthyle (8 mg, 0,1 mmol) et le mélange réactionnel est maintenu pendant 48 h à 15 température ambiante, puis concentré. Le résidu obtenu est dissous dans l'eau (10 ml), agité avec du chloroforme (2 x 10 ml), la phase organique est décantée pour séparer l'excès d'isothiocyanate de méthyle et la phase aqueuse est lyophilisée. On obtient 20 ainsi 103 mg du composé n°1 (rendement 95 %) pur à > 90 % (CLHP). Après purification par CLHP (colonne Nucléosil C-18, 5 μ ; éluant MeOH-eau 12:88 v/v), on obtient le composé n°1 (95 mg, 87%) ayant les caractéristiques suivantes :

25 - $[\alpha]_D + 108,7^\circ$ (c , 1,03, eau) ;
 - spectre de masse (FAB^+) : m/z 1229,2 (96 %, $[\text{M} + \text{Na}]^+$), 1207,4 (100, $[\text{M}+\text{H}]^+$).
 - solubilité dans l'eau : 775 g/l, 640 mM.

30 Exemple 2 : Préparation du 6^{I} -désoxy- 6^{I} -[3-(méthyl- α -D-glucopyranosid-6-yl)thiouréido]cyclomaltoheptaose (composé n°2)

Ce composé répond à la formule (IV) avec R^2 répondant à la formule (V) :

11



Ce composé est préparé par condensation du 6^I -désoxy- 6^I -isothiocyanatocyclomaltoheptaose avec le 5 méthyl 6-amino-6-désoxy- α -D-glucopyranoside (procédé A)

1. Préparation du 6^I -désoxy- 6^I -isothiocyanatocyclomaltoheptaose.

A une solution de 6^I -amino-6-désoxycyclomaltoheptaose (1,13 g, 1 mmol) dans un 10 mélange eau-acétone (3:2, 75 ml) on ajoute le carbonate de calcium (0,9 g, 3 mmol) et le thiophosgène (0,15 ml, 1,5 mmol). La suspension est agitée à température ambiante pendant 16 h, puis concentrée à la moitié de son volume, diluée par l'eau (30 ml) et déminéralisée 15 par agitation avec la résine échangeuse ionique Amberlite MB-6113 (H^+ , OH^- ; 5 ml) pendant 15 minutes. La solution aqueuse est filtrée et lyophilisée. Les caractéristiques de ce produit sont les suivantes :

20 - $[\alpha]_D +112,1^\circ$ (*c* 0,6, pyridine).

2. Préparation du méthyl 6-amino-6-désoxy- α -D-glucopyranoside.

Le méthyl-6-amino-6-désoxy- α -D-glucopyranoside 25 est préparé à partir du méthyl- α -D-glucopyranoside commercial en trois étapes, avec un rendement global de 80 % par le procédé décrit par J. M. Garcia Fernandez, C. Ortiz Mellet et J. Fuentes dans *J. Org. Chem.*, 58, 1993, pp. 5192-5199.

30 3. Préparation du composé 2.

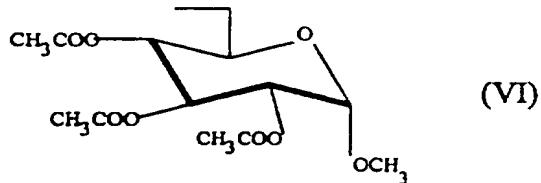
A une solution du 6^I -désoxy- 6^I -isothiocyanato-cyclomaltoheptaose obtenu dans l'étape

1 (100 mg, 85 μ mol) dans de la pyridine (3 ml), on ajoute le m^éthyl 6-amino-6-d^ésoxy- α -D-glucopyranoside obtenu en 2 (16 mg, 85 μ mol). Le m^élange r^éactionnel est agit^é ^à temp^{ér}ature ambiante pendant 48 h, puis 5 concentr^é. Les traces de pyridine sont ^élimin^ées par co^évaporation avec de l'eau (1 ml). Le r^ésidu est alors repris avec de l'eau et pr^écipit^é par addition d'^éthanol. On obtient ainsi 110 mg du compos^é n^o2 10 (rendement 95 %) pur ^à > 90 % (CLHP). Apr^{és} purification par CLHP (colonne Nucl^éosil, C-18, 5 μ ; 15 eluant MeOH-eau 12:88 v/v) on obtient le compos^é n^o2 ayant les caract^éristiques suivantes :

- $[\alpha]_D +96,9^\circ$ (*c* 0,66, eau) ;
- spectre de masse (FAB⁺): *m/z* 1391,2 (20 %, 20 $[M+Na]^+$), 1369,3 (100, $[M+H]^+$),
- solubilit^é dans l'eau : 710 g/l, 518 mM.

Exemple 3 : Préparation du 6^I-d^ésoxy-6^I-[m^éthyl-2,3,4-tri-O-ac^étyl- α -D-glucopyranosid-6-yl]-thiouréido]cyclomaltoheptaose (compos^é n^o3)

Ce compos^é r^épond ^à la formule (IV) avec R² r^épondant ^à la formule (VI) :



25

Il est pr^épar^é par le proc^éd^é B.

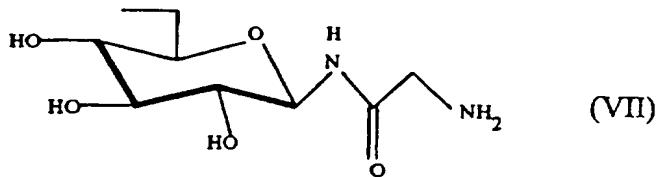
A une solution du 6^I-amino-6^I-d^ésoxycyclomaltoheptaose obtenu dans l'exemple 1 (118 mg, 0,1 mmol) dans de la pyridine (2 ml), on 30 ajoute le m^éthyl 2,3,4-tri-O-ac^étyl-6-d^ésoxy-6-isothicyanato- α -D-glucopyranoside pr^épar^é selon Garcia-Fernandez et al dans J. Org. Chem., 58, 1993,

pp. 5192-5199, (36 mg, 0,1 mmol), puis le mélange réactionnel est maintenu pendant 48 h à température ambiante, et concentré. Le résidu est dissous dans l'eau (10 ml), lavé par le chloroforme 5 (2 x 10 ml) et lyophilisé. On obtient ainsi 137 mg du composé n°3 (rendement de 92 %) ayant les caractéristiques suivantes :

10 - $[\alpha]_D + 116,1^\circ$ (*c* 0,62, eau) ;
 - spectre de masse (FAB⁺) : *m/z* 1517,2 (100 %, $[M+Na]^+$),
 - solubilité dans l'eau : 558 g/l, 373 mM.

15 Exemple 4 : Préparation du 6^I-désoxy-6^I-[3-(N-glycyl- β -D-glucopyranosylamin-6-yl)thiouréido]cyclomalto-heptaose (composé n°4)

Ce composé répond à la formule (IV) avec R² répondant à la formule :



Ce composé est obtenu par condensation du 6^I-désoxy-6^I-isothiocyanatocyclomaltoheptaose (voir exemple 2) avec la 6-amino-N-(N'-tert-butyloxycarbonyl) 25 glycyl-6-désoxy- β -D-glucopyranosylamine suivie d'une hydrolyse acide du groupement protecteur tert-butyloxycarbonyle (procédé A).

30 1) Préparation de la 6-amino-N-(N'-tert-butylloxycarbonyl)glycyl-6-désoxy- β -D-glucopyranosylamine.

Ce composé est préparé en effectuant les étapes suivantes :

- a) Préparation de la 6-azido-6-désoxy- β -D-glucopyranosylamine.

A une solution du 6-azido-6-désoxy-D-glucose (K. Dax et al., J. Carbohydr. Chem., 9, 1990, pp. 479-499 ; 4,3 g, 24,3 mmol) dans l'ammoniaque aqueux (16 M, 125 ml), on ajoute le bicarbonate d'ammonium (1,92 g, 24,3 mmol) et le mélange est agité à 40°C pendant 30 h, puis concentré à la moitié de volume, dilué avec de l'eau (150 ml) et lyophilisé. Le produit obtenu (4,3 g, 93 %) contient la 6-azido-6-désoxy- β -D-glucopyranosylamine à > 80 % pure (¹³C RMN) qui est utilisé dans l'étape suivante sans autre purification.

- b) Préparation de la 6-azido-N-(N'-tert-butyloxycarbonyl)glycyl-6-désoxy- β -D-glucopyranosylamine.

A une solution de N-(tert-butyloxycarbonyl)-glycine (66 mg, 0,40 mmol) dans du N,N-diméthylformamide (DMF, 1 ml), on ajoute, successivement, une solution de la 6-azido-6-désoxy- β -D-glucopyranosylamine obtenue en a) (100 mg, 0,49 mmol) dans du DMF (1 ml), une solution de 0-benzotriazol-1-yl-N,N,N',N'-tétraméthyluronium hexafluorophosphate (HBTU, 0,55 g, 1,47 mmol) dans du DMF (5 ml), de la diisopropyléthylamine (60 mg), et une solution de 1-hydroxybenzotriazole (HOEt, 66 mg, 0,49 mol) dans du DMF (1 ml). Le mélange est agité à température ambiante pendant 16 h, puis concentré et le résidu purifié par chromatographie sur colonne de gel de silice (chloroforme-méthanol 19:1 v/v). On obtient ainsi 90 mg de 6-azido-N-(N'-tert-butyloxycarbonyl)glycyl-6-désoxy- β -D-glucopyranosylamine (rendement de 55 %) ayant les caractéristiques suivantes :

- c) Préparation de la 6-amino-N-(N'-tert-butyloxycarbonyl)glycyl-6-désoxy-β-D-glucopyranosylamine

A une solution de la 6-azido-N-(N'-tert-butyloxycarbonyl)glycyl-6-désoxy-β-D-glucopyranosylamine obtenue en b) (0,14 g, 0,37 mmol) dans du DMF (6 ml), on ajoute le 1,3-propanedithiol (0,19 ml, 1,87 mmol) et l'éthyldiisopropylamine (0,19 ml, 1,17 mmol). Le mélange réactionnel est maintenu à température ambiante pendant 3 jours, puis concentré et le résidu est cristallisé dans de l'éthanol-eau. On obtient ainsi 125 mg de l'amine (rendement 92 %) ayant les caractéristiques suivantes :

15 - $[\alpha]_D -5^\circ (c, 08, \text{eau})$.

20 2. Préparation du 6^I-désoxy-6^I-[3'-(N-(N'-tert-butyloxycarbonyl)glycyl-β-D-glucopyranosylamino-6-yl)thiouréido]cyclomaltoheptaose.

A une solution du 6^I-désoxy-6^I-isothiocyanato-cyclomaltoheptaose (105 mg, 0,09 mmol) dans de la pyridine (2 ml), on ajoute la 6-amino-N-(N'-tert-butyl-oxycarbonyl) glycyl-6-désoxy-β-D-glucopyranosylamine (30 mg, 0,09 mol). Le mélange réactionnel est maintenu à température ambiante pendant 3 jours, puis concentré. Les traces de pyridine sont éliminées par coévaporation avec de l'eau. Le résidu est repris avec de l'eau (1 ml) et précipité par addition d'éthanol. On obtient ainsi 95 mg (rendement 70 %) d'une poudre blanche, présentant les caractéristiques suivantes :

35 - $[\alpha]_D +103,4^\circ (c, 0,9, \text{eau})$;
- spectre de masse (FAB+) : $m/z 1511,2 (100\%, [M+H]^+)$

3. Préparation du composé n°4.

Une solution du 6^I-désoxy-6^I-{3'-(N-(N'-*tert*-butyloxycarbonyl)glycyl-β-D-glucopyranosylamine-6-yl)thiouréido}cyclomaltoheptaose (77 mg, 51 µmol) dans l'acide trifluoroacétique-eau (9:1 v/v, 1 ml) est maintenue à température ambiante pendant 1 h, puis concentrée. Les traces d'acide trifluoroacétique sont éliminées par coévaporation avec de l'eau. Le résidu est dissous dans l'eau (5 ml), la solution résultante traitée par de la résine échangeuse ionique Amberlite IR-904 (OH⁻, 2 ml), filtrée et lyophilisée. On obtient ainsi 66 mg du composé n°4 (rendement de 91 %) pur à > 95 % (CLHP). Après purification par CLHP, on obtient le composé n°4 (58 mg, 80 %) ayant les caractéristiques suivantes :

- $[\alpha]_D +82,2^\circ$ (c 1,8, eau) ;
- spectre de masse (FAB+) : m/z 1411,3 (100%, M+H)⁺),
- solubilité dans l'eau : > 800 g/l, 567 mM.

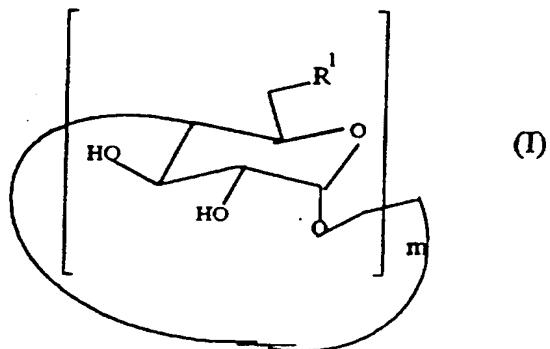
Exemple 5 : Inclusion du Taxotère dans le 6^I-désoxy-6^I-(N'-méthylthiouréido)cyclomaltoheptaose (composé n°1)

On part du Taxotère à l'état pur et on disperse 2,1 mg (2,6 µmol) de ce produit dans 3 ml d'une solution contenant 64,2 mmol/l du composé n°1 dans l'eau stérile, puis on agite la suspension obtenue à la température ambiante jusqu'à obtention d'une solution claire qui indique l'encapsulation du Taxotère dans la molécule de cyclodextrine. On obtient ainsi une augmentation importante de la solubilité du Taxotère (4,7 g/l, 5,8 mmol/l), celle-ci étant de l'ordre de 0,004 g/l en l'absence de cyclodextrine.

REVENDICATIONS

1. Thiouréido-cyclodextrine répondant à la formule :

5



10 dans laquelle m est égal à 6, 7 ou 8 et les R^1 qui peuvent être identiques ou différents, représentent OH ou NH-CS-NHR² avec R² représentant un groupe alkyle, un groupe dérivé d'un monosaccharide ou d'un oligo saccharide éventuellement substitué, un groupe dérivé d'un glycosyl-aminoacide ou un groupe dérivé d'un glycopeptide, à condition que l'un au moins des R^1 15 représente NH-CS-NHR².

2. Thiouréido-cyclodextrine selon la revendication 1, caractérisé en ce que tous les R^1 représentent -NH-CS-NH-R².

20 3. Thiouréido-cyclodextrine selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'un des R^1 représente -NH-CS-NH-R² et les autres R^1 représentent OH.

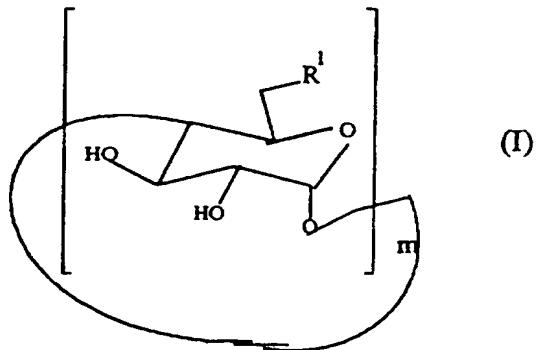
25 4. Thiouréido-cyclodextrine selon la revendication 3, caractérisé en ce que R² est le groupe méthyle.

5. Thiouréido-cyclodextrine selon la revendication 2, caractérisé en ce que R² est le groupe méthyl- α -D glucopyranosid-6-yle.

6. Thiouréido-cyclodextrine selon la revendication 3, caractérisé en ce que R^2 est le groupe méthyl-2,3,4-tri-O-acétyl- α -D-glucopyranosid-6-yle.

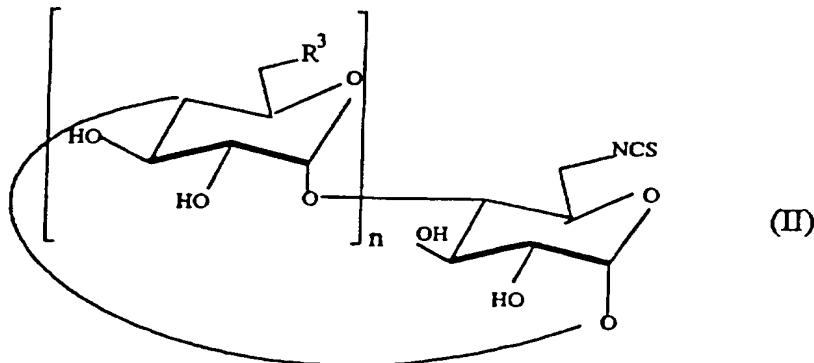
5 7. Thiouréido-cyclodextrine selon la revendication 3, caractérisé en ce que R^2 est le groupe N-glycyl- β -D glucopyranosylamin-6-yle.

8. Procédé de préparation d'une thiouréido-cyclodextrine répondant à la formule :



10

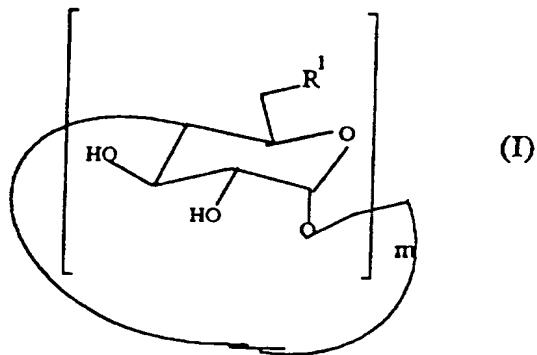
dans laquelle m est égal à 6, 7 ou 8 et les R^1 qui peuvent être identiques ou différents, représentent OH ou NH-CS-NHR² avec R² représentant un groupe alkyle, un 15 groupe dérivé d'un monosaccharide ou d'un oligo saccharide éventuellement substitué, un groupe dérivé d'un glycosyl-aminoacide ou un groupe dérivé d'un glycopeptide, à condition que l'un au moins des R¹ représente NH-CS-NHR²,
20 caractérisé en ce que l'on fait réagir une isocyanato cyclodextrine de formule :



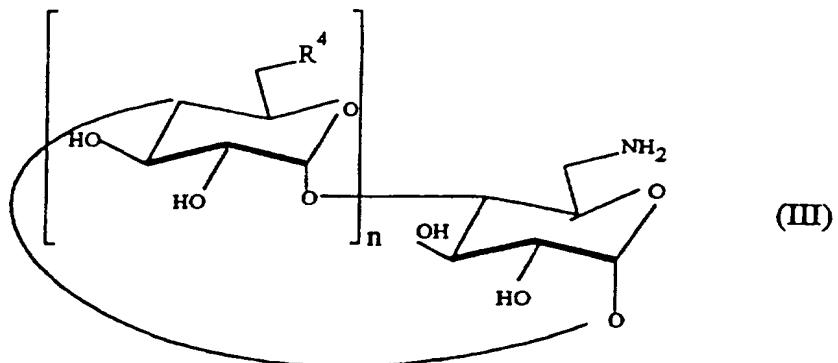
5 dans laquelle les R^3 , qui peuvent être identiques ou
 différents, représentent OH ou NCS, et n est égal à 5,
 6 ou 7, avec une amine de formule R^2-NH_2 dans laquelle
 R^2 à la signification donnée ci-dessus.

9. Procédé de préparation d'une thiouréido-cyclodextrine de formule :

10



15 dans laquelle m est égal à 6, 7 ou 8 et les R^1 qui
 peuvent être identiques ou différents, représentent OH
 ou $NH-CS-NHR^2$ avec R^2 représentant un groupe alkyle, un
 groupe dérivé d'un monosaccharide ou d'un oligo
 saccharide éventuellement substitué, un groupe dérivé
 d'un glycosyl-aminoacide ou un groupe dérivé d'un
 glycopeptide, à condition que l'un au moins des R^1
 20 représente $NH-CS-NHR^2$,
 caractérisé en ce que l'on fait réagir une amino-
 cyclodextrine de formule :



5 dans laquelle les R^4 , qui peuvent être identiques ou
 6 différents, représentent OH ou NH₂, et n est égal à 5,
 7 ou 7, avec un isothiocyanate de formule R^2 -NCS dans
 laquelle R^2 à la signification donnée ci-dessus.

10. Complexe d'inclusion d'une thiouréido-cyclodextrine selon l'une quelconque des revendications
 11 à 7 avec une molécule pharmacologiquement active.

11. Complexe selon la revendication 10,
 caractérisé en ce que la molécule pharmacologiquement
 active est un agent antitumoral ou antiparasitaire.

12. Complexe selon la revendication 11,
 caractérisé en ce que l'agent antitumoral ou
 antiparasitaire appartient à la famille du Taxol.

13. Composition pharmaceutique comprenant un
 complexe d'inclusion d'une thiouréido-cyclodextrine
 selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, avec
 20 un véhicule pharmacologiquement acceptable.

14. Composition pharmaceutique selon la
 revendication 13 sous forme de solution aqueuse.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No
PCT/FR 97/00449

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C08B37/16 A61K47/40

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C08B A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	No relevant documents disclosed -----	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- '&' document member of the same patent family

1

Date of the actual completion of the international search

25 June 1997

Date of mailing of the international search report

28.07.97

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Mazet, J-F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Land Internationale No
PCT/FR 97/00449

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C08B37/16 A61K47/40

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C08B A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porte la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
	Aucun document pertinent relevé -----	

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

1

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

25 Juin 1997

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

28.07.97

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mazet, J-F